



ÖSTERREICHISCHES
PATENTAMT

⑤ Int.Cl³: A61K 035/16

A61K 037/02

AI

① AT PATENTSCHRIFT

② Nr. 368 883

⑦ Patentinhaber: IMMUNO AKTIENGESELLSCHAFT FÜR CHEMISCH-MEDIZINISCHE PRODUKTE
WIEN, ÖSTERREICH

⑤ Gegenstand: VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG EINER NEUEN
BLUTGERINNUNGSFÖRDERNDEN PRÄPARATION AUF BASIS VON
HUMANPROTEINEN

⑥ Zusatz zu Patent Nr.

⑥ Ausscheidung aus:

② ① Angemeldet am: 1980 07 22, 3781/80

② ③ Ausstellungspriorität:

③ ③ ③ Unionspriorität:

④ Beginn der Patentdauer: 1982 04 15
Längste mögliche Dauer:

④ Ausgegeben am: 1982 11 25

⑦ Erfinder: EIBL JOHANN DR.
WIEN, ÖSTERREICH
SCHWARZ OTTO DR.
WIEN, ÖSTERREICH
ELSINGER FRITZ DR.
WIEN, ÖSTERREICH
PHILAPITSCH ANTON
EBENFURT, NIEDERÖSTERREICH

⑥ Abhängigkeit:

⑥ Druckschriften, die zur Abgrenzung vom Stand der Technik in Betracht gezogen wurden:

AT-PS 359645
US-PS 4 170 590

DE-AS 2715832

DE-OS 2734821

GB-PS 1092754

AT 368 883

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung einer neuen blutgerinnungsfördernden Präparation auf Basis von Humanproteinen mit einem Gehalt an den Gerinnungsfaktoren II, VII, IX und X und einer Faktor VIII-Inhibitor-Bypass-Aktivität.

Blutgerinnungsfördernde Präparationen mit Faktor VIII-Inhibitor-Bypass-Aktivität, abgekürzt 5 "FEIBA" (Factor Eight Inhibitor-Bypassing Activity), sind bekannt. In der AT-PS Nr.350726 (entsprechend der US-PS Nr.4,160,025 bzw. der DE-OS 2734821) ist die Herstellung einer solchen Präparation beschrieben. Sie wird bei der Behandlung von Patienten, die an Hämophilie A leiden und deren Blut einen gegen Faktor VIII gerichteten Hemmstoff (Inhibitor) enthält, mit Erfolg angewendet. Die chemische Struktur des FEIBA-Faktors ist bisher unbekannt. Man weiß nur, daß 10 es sich um ein Protein mit einem Molekulargewicht im Bereich von etwa 100000 handelt. Die Herstellung der Präparation nach den oben genannten Patentschriften erfolgte durch Generierung aus menschlichem, Citrationen enthaltendem Plasma in Abwesenheit von freien Calciumionen durch Behandlung mit wasserunlöslichen anorganischen gerinnungsphysiologisch-oberflächenaktiven Stoffen, wie Kieselgel oder Kaolin, und anschließende Adsorption und Eluierung, wobei ein Gemisch 15 der Faktoren II, VII, IX und X, des Faktors FEIBA und anderer Proteine erhalten wird, dessen Zusammensetzung bisher nicht beschrieben ist.

Obwohl, wie erwähnt, die Präparation nach der DE-OS 2734821 sich bei der Behandlung von Faktor VIII-Inhibitor-Patienten als wertvoll erwiesen hat, besteht die Aufgabe, den Anwendungsbereich zu erweitern und die Verträglichkeit von FEIBA-Präparationen weiter zu verbessern, ins- 20 besondere unerwünschte Nebenreaktionen, wie thrombogene und vasoaktive Wirkungen, auf ein Minimum herabzusetzen.

Es wurde gefunden, daß eine neue blutgerinnungsfördernde Präparation auf Basis von Humanproteinen mit einem Gehalt an den Gerinnungsfaktoren II, VII, IX und X und einer Faktor VIII-Inhibitor-Bypass-Aktivität hergestellt werden kann, mit welcher die vorstehend umschriebene 25 Aufgabe lösbar ist, sofern die Präparation die folgenden Merkmale aufweist, nämlich

- daß sie frei ist von thrombogener Aktivität bis zu mindestens 2 Einheiten FEIBA/kg Kaninchen im thromboseinduzierenden Aktivitätstest nach Wessler,
- daß sie frei ist von Kallikrein-Aktivität und frei von Präkallikrein-Aktivator-Aktivität - gemessen in einer wässrigen Lösung der Präparation mit einer FEIBA-Konzentration bis 30 zu mindestens 10 Einheiten/ml,
- daß sie affinitätschromatographisch an Dextransulfat-Agarose mittels eines NaCl-Gradienten derart auftrennbar ist, daß das Protein mit Faktor IX-Aktivität bei niedrigerer NaCl-Konzentration eluiert als das Protein mit FEIB-Aktivität,
- daß die das Protein mit Faktor IX-Aktivität und das Protein mit FEIB-Aktivität enthaltenden Eluate bei elektrophoretischer Auftrennung α - und β -Globuline enthalten, wobei die Auftrennungskurve im α -Bereich einen Hauptgipfel entsprechend 60 bis 80% des Gesamtproteins, eine daran anschließende Schulter von 10 bis 20% des Gesamtproteins sowie einen an den schulterförmigen Verlauf der Auftrennungskurve anschließenden schwach ausgeprägten Gipfel im β -Globulinbereich entsprechend einem Gehalt von 10 bis 20% des Gesamtproteins aufweist. 35 40

Die Merkmale: Freisein der Präparation von thrombogener Aktivität und von Kallikrein-Aktivität bzw. von Präkallikrein-Aktivator-Aktivität - letztere sind für die vasoaktiven Wirkungen verantwortlich - bedeuten, daß die Präparation eine hervorragende Verträglichkeit besitzt. Der thromboseinduzierende Aktivitätstest und die Tests auf Kallikrein-Aktivität und Präkallikrein-Aktivator-Aktivität sind dem Fachmann bekannt. Im einzelnen werden diese im Anschluß an die Beispiele noch genauer angegeben. 45

Das weitere Merkmal der erfindungsgemäß herstellbaren Präparation, die Auftrennbarkeit auf affinitätschromatographischem Weg an Dextransulfat-Agarose mittels eines NaCl-Gradienten ist in Fig.1 der Zeichnungen an Hand eines Beispiels veranschaulicht. Die Methode der Affinitätschromatographie an Dextransulfat-Agarose ist dem Fachmann bekannt (D.S. Pepper and C. Prowse, Thrombosis Research 11 [1977], 687-692). Hierbei wird Dextransulfat (Molekulargewicht 500000) an CNBr-aktivierte Sepharose 4 B (Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala, Schweden) gekoppelt. Die 50 so gewonnene Dextransulfat-Sepharose wird in 0,4% Trinatriumcitrat \cdot 2H₂O-Lösung (p_H 7,4)

äquilibriert und in eine Säule gefüllt. Die zu untersuchende Probe wird auf die Säule aufgetragen und anschließend mit einer NaCl-Lösung in 0,4% Trinatriumcitrat-2H₂O (p_H 7,4) mit steigender NaCl-Konzentration fraktioniert eluiert.

In Fig.1 sind auf der Abszisse die Fraktionsnummern der Eluate aufgetragen. Auf der linken Ordinate sind die Aktivitäten der Gerinnungsfaktoren in Einheiten pro ml aufgetragen und auf der rechten Ordinate die Konzentration des Natriumchlorid-Gradienten in Mol/l. Der lineare Verlauf des Gradienten ist als Linie G eingetragen. Wie aus Fig.1 ersichtlich ist, eluiert das Protein mit Faktor IX-Aktivität im Bereich von 0,1 bis 0,5 (molar), mit einem Maximum bei 0,3 (molar), das Protein mit FEIB-Aktivität bei einer NaCl-Konzentration im Bereich von 0,3 bis 0,5 (molar), mit einem Maximum bei 0,4 (molar). Die steigende NaCl-Konzentration ist an dem NaCl-Gradienten G zu erkennen, der von 0-molar bis 0,65-molar NaCl reicht.

Schließlich ist für die erfindungsgemäß herstellbare Präparation als weiteres Merkmal auch der Gehalt an Globulinen bei elektrophoretischer Auftrennung charakteristisch, was in Fig.2 der Zeichnungen erläutert wird. Der obere Teil der Fig.2 veranschaulicht die Auftrennungskurve der erfindungsgemäß herstellbaren, die Proteine mit Faktor IX-Aktivität und FEIB-Aktivität enthaltenden Eluate der Dextransulfat-Sephrose-Chromatographie an Hand eines Beispiels, wogegen der untere Teil der Fig.2 die elektrophoretische Auftrennungskurve eines nativen Humanplasmas wiedergibt. Es ist zu erkennen, daß bei diesem Beispiel der Hauptgipfel im α -Globulinbereich 70% des Gesamtproteins beträgt. An den Hauptgipfel schließt sich im α -Globulinbereich eine Schulter an, die 14% des Gesamtproteingehaltes ausmacht, worauf anschließend an die Schulter im β -Globulinbereich ein schwach ausgeprägter Gipfel folgt, der 16% des Gesamtproteins beträgt.

Vorteilhaft besteht eine Eigenschaft der erfindungsgemäß herstellbaren Präparation darin, daß die FEIB-Aktivität nach einstündiger Inkubation in Faktor VIII-Inhibitor-Plasma mindestens zu 50% erhalten bleibt. Diese Eigenschaft deutet auf eine länger anhaltende Wirksamkeit bei Applikation an Faktor VIII-Inhibitor-Patienten hin.

Vorteilhaft besteht eine weitere Eigenschaft der erfindungsgemäß herstellbaren Präparation darin, daß die Faktor IX-Aktivität nach einstündiger Inkubation in Faktor IX-Mangelplasma mindestens zu 50% erhalten bleibt. Dies bedeutet, daß die Präparation wenig oder einen sehr geringen Anteil an aktiviertem Faktor IX enthält. Es ist bekannt, daß aktivierter Faktor IX in Humanplasma inaktiviert wird. Aktivierter Faktor IX würde nachteilige thrombogene Wirkungen verursachen. Aus der Literatur (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 74, No. 7, 3028-3032, Juli 1977, "In vitro and in vivo correlation of clotting protease activity: Effect of heparin" von S.N. Gitel, R.C. Stephenson und S. Wessler) ist bekannt, daß gerade der Faktor IXa gegenüber andern aktivierten Gerinnungsfaktoren, wie Xa und IIa (Thrombin), die höchste thrombogene Wirksamkeit besitzt.

Schließlich besteht auch vorteilhaft eine Eigenschaft der erfindungsgemäßen blutgerinnungsfördernden Präparation darin, daß sie einen Gehalt an Inter- α -Trypsin-Inhibitor (ITI) von 0,05 bis 5 mg/FEIBA-Einheit besitzt.

Der Gehalt an ITI bewirkt, daß die Thrombogenität der erfindungsgemäßen Präparation im Wessler-Test niedrig ist.

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung der neuen blutgerinnungsfördernden Präparation auf Basis von Humanproteinen mit einem Gehalt an den Gerinnungsfaktoren II, VII, IX und X und einer Faktor VIII-Inhibitor-Bypass-Aktivität ist dadurch gekennzeichnet, daß Humanplasma mit sulfatierten hochpolymeren Kohlehydraten und/oder mit basischen Ionenaustauschern behandelt und das Proteingemisch mit generierter FEIB-Aktivität adsorbiert wird, worauf es durch Eluieren und Konzentrieren gewonnen wird.

Bei der Durchführung des Verfahrens ist darauf zu achten, daß das Plasma bzw. die Reaktionsteilnehmer frei gehalten werden von Substanzen, die die Antithrombin III-Aktivität zu steigern imstande sind, wie Heparin oder Heparinoiden.

Nach einer Ausführungsform der Erfindung wird das Plasma zuerst mit sulfatierten hochpolymeren Kohlehydraten kurzzeitig behandelt, das Proteingemisch mit generierter FEIB-Aktivität hierauf an einem Ionenaustauscher auf Dextranbasis adsorbiert und unmittelbar darauf eluiert und konzentriert.

Nach einer andern Ausführungsform der Erfindung wird das Plasma mit einem Ionenaustauscher auf Dextranbasis behandelt und nach mindestens zweistündiger Einwirkung das an dem Ionenaustauscher adsorbierte Proteingemisch mit generierter FEIB-Aktivität eluiert und sodann konzentriert. Bei dieser Ausführungsform ist die Generierung der FEIB-Aktivität von der Einwirkungs-
5 kungsdauer abhängig. Diese kann bis zu 48 h betragen.

Bei der Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens kann der p_H -Wert zwischen 6 und 9 betragen, die Temperatur zwischen 0 und 40°C liegen, die angewendeten Mengen an Dextransulfat können 0,1 bis 500 mg/l Plasma betragen, und an DEAE-Sephadex können 0,01 bis 10 g/l Plasma eingesetzt werden. Als Ausgangsmaterial für das erfindungsgemäße Verfahren kommt nicht
10 nur natives Humanplasma, sondern auch Plasmafraktionen, z.B. Kryüberstand und der Cohn-I-Überstand (8% Alkohol) in Frage.

Das Verfahren gemäß der Erfindung und die Eigenschaften der danach hergestellten Präparationen werden in den folgenden Beispielen näher erläutert, wobei im Anschluß an die Beispiele die angewendeten Bestimmungsmethoden erläutert und die Ergebnisse tabellarisch erfaßt sind.

15 Beispiel 1: 1000 l frisch gefrorenes menschliches Citratplasma werden bei 0 bis +4°C aufgetaut und das dabei anfallende Kryopräzipitat durch Zentrifugation bei +2°C abgetrennt. Dem resultierenden "Kryüberstand" werden bei einem nativen p_H -Wert von 7,7 10 g Dextransulfat (Molekulargewicht 500000) zugesetzt und 15 min bei +4°C gerührt, wobei die Substanz FEIBA generiert wird.

20 Hierauf werden 500 g des Anionenaustauschers DEAE-Sephadex A-50 (Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala, Schweden) zugesetzt und eine halbe Stunde bei +4°C gerührt, wobei die generierte Substanz FEIBA zusammen mit den Faktoren des Prothrombinkomplexes (II, VII, IX, X) und inerten Proteinen an das unlösliche DEAE-Sephadex adsorbiert wird.

Das DEAE-Sephadex wird unmittelbar nach dem Adsorptionsvorgang durch Zentrifugation oder
25 Filtration abgetrennt; das überstehende Plasma kann zur Gewinnung von γ -Globulin und Albumin verwendet werden.

Das DEAE-Sephadex wird einem zweifachen Waschprozeß unterworfen; dabei wird das DEAE-Sephadex zuerst mit 50 l einer Lösung, bestehend aus 4 g/l Trinatriumcitrat·2H₂O, 7 g/l Natriumchlorid und 18 g/l Dinatriumhydrogenphosphat·12H₂O in destilliertem Wasser, p_H -Wert 7,5, während
30 15 min bei +4°C gerührt. Nach Abtrennung durch Filtration wird das DEAE-Sephadex mit 50 l einer Lösung, bestehend aus 4 g/l Trinatriumcitrat·2H₂O und 7 g/l Natriumchlorid in destilliertem Wasser, p_H -Wert 7,5, während 15 min bei +4°C gerührt und hierauf wieder durch Filtration abgetrennt.

Zur Elution wird das DEAE-Sephadex mit 25 l einer Lösung, bestehend aus 30 g/l Natriumchlorid und 1 g/l Trinatriumcitrat·2H₂O in destilliertem Wasser, p_H -Wert 7,0, während 20 min bei
35 +4°C gerührt. Das Eluat, enthaltend die generierte Substanz FEIBA, die Faktoren des Prothrombinkomplexes (II, VII, IX, X) sowie inertes Protein, wird durch Filtration gewonnen, das DEAE-Sephadex wird verworfen. Das Eluat wird über Nacht gegen 1000 l destilliertes Wasser bei +4°C dialysiert, hierauf eingefroren und einem ersten Lyophilisationsvorgang unterworfen. In dem re-
40 sultierenden Bulk-Material wird die FEIB-Aktivität bestimmt, u.zw. nach der in der DE-OS 2734821 beschriebenen Methode.

Für die Herstellung der pharmazeutisch anwendbaren Präparation mit FEIB-Aktivität wird das Bulk-Material in so viel destilliertem, pyrogenfreiem Wasser gelöst, daß die FEIB-Aktivität zwischen 10 und 50 FEIBA-Einheiten/ml beträgt (vorliegendenfalls 25 FEIBA-Einheiten/ml). Nach Zu-
45 satz der nötigen Salze zur Herstellung der Isotonie und Einstellung des p_H -Wertes zwischen 7,0 und 7,5 wird die Lösung durch Membranfilter geklärt und zuletzt durch ein 0,2 μ m Membranfilter steriltriftriert. Die Lösung wird unter sterilen Bedingungen zu 20 ml in die Endbehälter verfüllt, tiefgefroren und lyophilisiert.

Beispiel 2: 1000 l frisch gefrorenes menschliches Citratplasma werden bei 0 bis +4°C aufge-
50 taut und das dabei anfallende Kryopräzipitat durch Zentrifugation bei +2°C abgetrennt. Dem resultierenden "Kryüberstand" werden bei einem nativen p_H -Wert von 7,7 500 g des Anionenaustauschers DEAE-Sephadex A-50 (Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala, Schweden) zugesetzt und eine halbe Stunde bei +4°C gerührt, wobei die Faktoren des Prothrombinkomplexes (II, VII, IX, X)

und inerte Proteine an das DEAE-Sephadex adsorbiert werden.

Hierauf wird das Gemisch 12 h bei +4°C stehengelassen; während dieser "Kontaktzeit" wird die Substanz FEIBA generiert.

Das DEAE-Sephadex wird nach der 12stündigen "Kontaktzeit" durch Zentrifugation oder 5 Filtration abgetrennt; das überstehende Plasma kann zur Gewinnung von γ -Globulin und Albumin verwendet werden.

Die weitere Verarbeitung des DEAE-Sephadex (zweimalige Waschung, Elution usw.) erfolgt in gleicher Weise, wie in Beispiel 1 beschrieben.

Der thromboseinduzierende Aktivitätstest nach Wessler, welcher in der Literatur, u.zw. in 10 J. Appl. Physiol. 14 (1959), 943-946, "Biologic assay of a thrombosis-inducing activity in human serum" von Stanford Wessler, Stanley M. Reimer und Mindel C. Sheps, beschrieben ist, wird folgendermaßen ausgeführt: Pro Test werden 3 Kaninchen verwendet. Die Tiere werden mit Nembutal narkotisiert; nach zusätzlicher lokaler Anästhesie wird die herzseitige vena jugularis freigelegt, im Abstand von 1 bis 2 cm werden zwei Ligaturen vorbereitet.

15 Das zu untersuchende Präparat wird nun in der gewünschten Dosis in die der freigelegten vena jugularis gegenüberliegende Ohrvene innerhalb von 15 s injiziert. Innerhalb von 10 bis 25 s nach Beendigung der Injektion des Präparates werden die vorbereiteten Ligaturen zugezogen. Das isolierte Venensegment bleibt nun 10 min in situ im Kaninchen. Hierauf wird das Venenstück aus dem Tier entfernt und in einer Petrischale in einer 5% Natriumcitratlösung aufgeschnitten und 20 der Inhalt nach folgendem Schema bewertet.

0 = kein Gerinnsel

1 = wenige makroskopisch sichtbare Fibrinpartikel

2 = einige kleine Thromben

3 = zwei oder mehr große Thromben

25 4 = ein einziger, das ganze isolierte Venensegment ausfüllender Thrombus

Der Test wird im Falle einer 4-Reaktion als positiv gewertet. Für die erfindungsgemäße Präparation ist wesentlich, daß bei Injektion der Präparation, enthaltend bis zu mindestens 2 Einheiten FEIBA/kg Versuchstier, keine 4-Reaktion auftritt.

Die Bestimmung der Kallikrein-Aktivität und der Präkallikrein-Aktivator-Aktivität wird in fol- 30 gender Weise durchgeführt.

Kallikrein:

1. Methode:

Kallikrein spaltet amidolytisch para-Nitroanilin (pNA) von einem spezifischen chromogenen Substrat ab. Die Konzentration von pNA wird photometrisch bei einer Wellenlänge von 405 nm ge- 35 messen.

2. Reagenzien:

Puffer:

Lösung A: 3,03 g "TRIS" und 1,7 g Imidazol werden in 500 ml 0,1 n Salzsäure gelöst und mit Wasser auf 1000 ml aufgefüllt.

40 Lösung B: 4,04 g "TRIS" und 2,27 g Imidazol werden in 500 ml 0,1 n Salzsäure gelöst und mit Wasser auf 1000 ml aufgefüllt.

Lösung C: 11,69 g Natriumchlorid werden mit Wasser auf 1000 ml gelöst.

Lösung A und B werden so lange gemischt, bis ein p_H -Wert von 7,9 erreicht ist. Diese Mischung wird mit dem gleichen Volumen von Lösung C versetzt.

45 Chromogenes Substrat S-2302 (Firma Kabi Stockholm):

H-D-Prolyl-L-phenylalanyl-L-arginin-p-nitroanilid-dihydrochlorid

1 mmolare Lösung von S-2302: 25 mg in 41 ml Wasser.

Probe:

Die Probe wird im Originalvolumen gelöst und unverdünnt in den Test eingesetzt.

3. Test:

In einem Wasserbad bei einer Temperatur von 37°C werden in ein Plastikröhrchen

1,0 ml Puffer, vortemperierte auf 37°C

0,1 ml Probe

5 0,2 ml chromogenes Substrat S-2302

pipettiert. Diese Mischung wird in ein auf 37°C temperiertes Photometer eingebracht und die Zunahme der optischen Dichte pro Minute ($\Delta OD/min$) bei einer Wellenlänge von 405 nm, bei einer Schichtdicke von 10 mm, gemessen. Die Aktivität einer Probe wird in $\Delta OD/min$ ausgedrückt.

Präkallikrein-Aktivator:

10 1. Methode:

Aus einer gereinigten Präkallikrein-Präparation (PKK) wird mittels eines Präkallikrein-Aktivators (PKKA) Kallikrein (KK) generiert. Das Kallikrein spaltet amidolytisch para-Nitroanilin (pNA) von einem spezifischen chromogenen Substrat ab. Die Konzentration von pNA wird photometrisch bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen.

15 2. Reagenzien:

Puffer und chromogenes Substrat entsprechen den bei der Kallikrein-Bestimmung beschriebenen Reagenzien.

Präkallikrein-Präparation:

Die Herstellung der Präparation erfolgt nach einer Vorschrift von Harpel, modifiziert von 20 M.S. Horowitz (New York Blood Center). Dabei wird humanes Citratplasma mit Hilfe einer DEAE-Cellulose behandelt. Die nicht an DEAE-Cellulose gebundene Fraktion enthält das Präkallikrein.

Positive Kontrolle (Standard):

Als Standard (= Bezugswert) wird eine Albuminpräparation des Bureau of Biologics (BoB) der Food and Drug Administration, Bethesda, Maryland 20205, USA, verwendet. Diese Präparation ent- 25 hält einen Präkallikrein-Aktivator. Die Kallikreingeneration mit diesem BoB-Standard stellt den Bezugswert 1 dar bzw. wird gleich 100% gesetzt.

Probe:

Die Probe wird im Originalvolumen gelöst und unverdünnt in den Test eingesetzt.

3. Test:

30 In einem Wasserbad bei einer Temperatur von 37°C werden in ein Plastikröhrchen

0,05 ml Präkallikrein-Präparation

0,05 ml Probe a) BoB-Standard für den Bezugswert

b) Testprobe (in einem zweiten Testansatz)

pipettiert. Nach einer Inkubation von 10 min bei 37°C wird

35 0,7 ml Pufferlösung

0,1 ml chromogenes Substrat S-2302

pipettiert. Diese Mischung wird in ein auf 37°C temperiertes Photometer eingebracht und die Zunahme der optischen Dichte pro Minute ($\Delta OD/min$) bei einer Wellenlänge von 405 nm, bei einer Schichtdicke von 10 mm, gemessen. Die Aktivität einer Probe ($\Delta OD/min$) wird faktoriell - gegen- 40 über dem BoB-Standard mit der Zahl 1 - bzw. in % vom BoB-Standard ausgedrückt.

Die Charakterisierung der erfindungsgemäßen Präparation durch affinitätschromatographische Auftrennung der Präparation an Dextransulfat-Sepharose wurde bereits in Verbindung mit Fig.1 beschrieben.

Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine mit Faktor IX-Aktivität und mit FEIB-Akti- 45 vität, auf die in Verbindung mit Fig.2 hingewiesen wird, kann in folgender Weise durchgeführt werden.

Als Träger für die elektrophoretische Auftrennung der verschiedenen Proteine dient eine Celluloseacetat-Membran, welche mit dem Elektrophoresepuffer (p_H 8,6, Ionenstärke 0,075) befeuchtet ist. Auf dieser Membran werden die zu analysierenden Proben - zusammen mit einem normalen

Humanplasma als Standard - aufgetragen und hierauf im elektrischen Feld aufgetrennt; die Trennung erfolgt dadurch, daß verschieden geladene Proteine im elektrischen Feld verschieden rasch wandern. Zu diesem Zweck wird die mit den Proben versehene Membran in einer speziellen, mit Elektrophoresepuffer gefüllten Zelle 16 bis 18 min bei einer Spannung von 250 V und 4 bis 6 mA
5 anfänglicher Stromstärke behandelt.

Nach Beendigung des Trennvorganges werden die verschiedenen Proteine durch Einlegen der Membran in eine Fixier- bzw. Färbelösung sichtbar gemacht. Nach einigen Spülbädern wird die Membran in einem weiteren Bad transparent gemacht, auf eine Glasplatte aufgetragen und in einem Trockenschrank bei 100°C getrocknet.

10 Die getrocknete Membran wird nun in einem automatisch registrierenden und integrierenden Densitometer analysiert und ergibt Auftrennungskurven, wie in Fig.2 dargestellt. Die verschiedenen Proteine erscheinen dabei als verschieden starke Banden, deren Flächen den Relativprozentwerten der entsprechenden Proteine proportional sind, wobei diese Flächen durch die automatische Integration des Densitometers bestimmt werden.

15 Die Zuordnung der verschiedenen Banden bzw. Proteine der Testprobe zu definierten Proteinen bzw. Proteingruppen erfolgt durch Vergleich mit den Banden des als Standard mitanalysierten normalen Humanplasmas. Letzteres wird bei der elektrophoretischen Analyse in 5 Proteingruppen aufgetrennt, welche definitionsgemäß - in der Reihenfolge abnehmender Wanderungsgeschwindigkeiten im elektrischen Feld - wie folgt bezeichnet werden: Albumin, α -Globulin, β -Globulin,
20 Fibrinogen und γ -Globulin.

Die Definition der FEIBA-Einheit sowie ihre Bestimmung (Wirksamkeitstest) ist in der Literatur, u.zw. in der AT-PS Nr.350726 (US-PS Nr.4,160,025, DE-OS 2734821) beschrieben. Die Bestimmung der Aktivität der Gerinnungsfaktoren II, VII, IX und X ist ebenfalls in der vorgenannten Literatur beschrieben.

25 Die Bestimmung der Restaktivität von FEIBA nach Inkubation in Faktor VIII-Inhibitor-Plasma wird in folgender Weise durchgeführt.

1. Reagenzien:

Die zu verwendenden Reagenzien sind in Verbindung mit der Bestimmung der FEIBA-Einheiten (Wirksamkeitstest) in der AT-PS Nr.350726 (US-PS Nr.4,160,025, DE-OS 2734821) beschrieben.

30 2. Test:

Von einer auf 50 FEIBA-Einheiten/ml eingestellten Präparation werden mit einer Lösung von 7 g/l Natriumchlorid und 7 g/l Natriumcitrat \cdot 2H₂O als Verdünnungsmittel folgende Verdünnungen hergestellt: 1 : 2, 1 : 4, 1 : 8, 1 : 16, 1 : 32 und 1 : 64. Von diesen 6 Verdünnungen wird jeweils eine 1 : 10-Verdünnung in Faktor VIII-Inhibitor-Plasma hergestellt (0,05 ml vorverdünnte
35 Probe + 0,45 ml Faktor VIII-Inhibitor-Plasma).

Diese 1 : 10-Verdünnungen in Faktor VIII-Inhibitor-Plasma ("Inkubationsgemische") werden nun sofort und nach 1 h Inkubation bei 37°C nach folgendem Testschema analysiert:

0,1 ml "Inkubationsgemisch"

0,1 ml Phospholipid-Kaolin-Suspension 1 min bei 37°C inkubieren

40 0,1 ml m/40 Calciumchlorid

Die Zeit von der Calciumchloridzugabe bis zur Gerinnelsbildung wird mit einer Stoppuhr wie im Wirksamkeitstest gemessen.

3. Berechnung der Restaktivität:

Analog zur Beschreibung im Wirksamkeitstest wird nun mit den Gerinnungszeiten der sofort
45 bestimmten Verdünnungen eine Eichkurve erstellt (unverdünnte Probe = 50 FEIBA-Einheiten/ml). Die Aktivitäten (FEIBA-Einheiten/ml) der 1 h inkubierten verschiedenen Verdünnungen werden nun unter Verwendung der Eichkurve berechnet und in % der jeweiligen Aktivitäten der nichtinkubierten Verdünnungen ausgedrückt. Die Mittelwerte der so berechneten Aktivitäten ergeben dann die durchschnittliche Restaktivität der Probe nach 1 h Inkubation, ausgedrückt in % der Ausgangsaktivität
50 vor Inkubation.

Die Bestimmung der Restaktivität von Faktor IX nach Inkubation in Faktor IX-Mangelplasma

wird in folgender Weise durchgeführt:

1. Reagenzien:

Faktor IX-Mangelplasma: Citratplasma eines Patienten mit schwerer Hämophilie B (Faktor IX unter 1%).

- 5 Phospholipid/Kaolin-Suspension: PTT-Reagenz der Firma Immuno Diagnostica Ges.m.b.H. Für die Testung wird die erforderliche Menge Faktor IX-Mangelplasma mit einem gleichen Volumen Phospholipid/Kaolin-Suspension gemischt, 5 min bei 37°C inkubiert und dann während der Testperiode in einem Eisbad aufbewahrt.

10 Citrat-/Kochsalzlösung als Verdünnungsmittel für Proben: 7 g/l Trinatriumcitrat-2H₂O, 7 g/l Natriumchlorid.

Calciumchlorid m/20 (0,05 molar): während der Testperiode bei 37°C aufbewahren.

2. Test:

Von einer auf 50 Faktor IX-Einheiten/ml eingestellten Präparation werden 7 geometrische Verdünnungen (1 : 2, 1 : 4 usw. bis 1 : 128) mit Citrat-/Kochsalzlösung hergestellt. Von der unverdünnten Probe sowie von den 7 geometrischen Verdünnungen wird jeweils eine 1 : 10-Verdünnung in Faktor IX-Mangelplasma hergestellt (0,05 ml vorverdünnte Probe + 0,45 ml Faktor IX-Mangelplasma).

Diese 1 : 10-Verdünnungen in Faktor IX-Mangelplasma ("Inkubationsgemische") werden nun sofort und nach 1 h Inkubation bei 37°C nach folgendem Testschema analysiert, wobei jedes Inkubationsgemisch vor der Bestimmung 1 : 10 mit Citrat-/Kochsalzlösung verdünnt wird:

0,2 ml Gemisch von Faktor IX-Mangelplasma und Phospholipid/Kaolin

0,1 ml "Inkubationsgemisch", 1 : 10 verdünnt mit Citrat-/Kochsalzlösung

1 min bei 37°C inkubieren

0,1 ml m/20 Calciumchlorid

- 25 Die Zeit von der Calciumchloridzugabe bis zur Gerinnungsbildung wird mit einer Stoppuhr gemessen.

3. Berechnung der Restaktivität:

Mit den Gerinnungszeiten der sofort bestimmten Verdünnungen wird eine Eichkurve erstellt (unverdünnte Probe = 50 Faktor IX-Einheiten/ml), indem man die Gerinnungszeiten gegen die entsprechenden Verdünnungen auf doppelt logarithmischem Millimeterpapier aufträgt. Die Aktivitäten (Faktor IX-Einheiten/ml) der 1 h inkubierten verschiedenen Verdünnungen werden nun unter Verwendung der Eichkurve berechnet und in % der jeweiligen Aktivitäten der nichtinkubierten Verdünnungen ausgedrückt. Die Mittelwerte der so berechneten Aktivitäten ergeben dann die durchschnittliche Restaktivität der Probe nach 1 h Inkubation, ausgedrückt in % der Ausgangsaktivität vor Inkubation.

35 Immunologische Bestimmung des Inter- α -Trypsin-Inhibitors (ITI):

1. Methode:

Die Bestimmung erfolgt mit der Ouchterlony-Technik, wobei ein spezifischer Antikörper gegen eine antigenhaltige Probe in einem Agarmedium diffundiert. Das Antigen reagiert spezifisch mit dem Antikörper und bildet eine Immunpräzipitationsbande, die als positive Reaktion gewertet wird.

2. Reagenzien:

Antiserum gegen ITI vom Kaninchen, Behringwerke AG, Marburg/Lahn, BRD

Agar: Eine Lösung von 1,25 g Agar, 0,9 g Natriumchlorid und 100 mg Natriumazid in 100 ml Wasser wird kurz aufgekocht und die heiße, homogene Lösung in einer Schichtdicke von zirka 2 mm in Platten gegossen. In das abgekühlte, verfestigte Gel werden im Abstand von 5 mm zirka 2 mm große Löcher in 2 Reihen gestanzt.

Standard bzw. Probe:

Als Eichsubstanz dient ein Protein-Standardserum der Behringwerke mit einem definierten Gehalt an ITI. Von diesem Referenzserum wird eine geometrische Verdünnungsreihe in physiologischer Natriumchloridlösung (9 g NaCl/l) hergestellt.

Mit der zu testenden Probe wird wie mit dem Standard verfahren.

3. Test:

In eine Lochreihe des Agars werden die Verdünnungen der Eichsubstanz bzw. der zu testenden Probe eingebracht, in der nebenanliegenden Lochreihe wird das unverdünnte spezifische Antiserum pipettiert. Die so beschickte Agarplatte wird 15 h bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgt die Ablesung der Immunpräzipitationen.

4. Berechnung der ITI-Konzentration:

Als Maßstab für die ITI-Konzentration einer Probe gilt jene Verdünnungsstufe, bei der gerade noch eine Präzipitation sichtbar ist ("Titer" der Probe). Die ITI-Konzentration der zu testenden Probe errechnet sich wie folgt:

$$\frac{\text{Titer der Testprobe}}{\text{Titer des Standards}} \times \text{ITI-Konzentration des Standards}$$

Die ITI-Konzentration wird in mg % (mg/100 ml) angegeben.

Die nach den Beispielen 1 und 2 hergestellten Präparationen hatten nach Durchführung der vorstehenden Bestimmungsmethoden die folgenden Kennwerte:

15 Die Darstellungen in den Fig.1 und 2 der Zeichnungen entsprechen hinsichtlich der affinitätschromatographischen und elektrophoretischen Auftrennung den nachstehenden Angaben des Beispiels 2.

	FEIBA-Präparation hergestellt nach	
	Beispiel 1	Beispiel 2
Feiba-Einheiten/ml	26,0	24,2
Faktor II-Einheiten/ml	25,8	23,0
Faktor VII-Einheiten/ml	24,0	26,5
Faktor IX-Einheiten/ml	28,2	27,4
Faktor X-Einheiten/ml	24,1	22,1
Thrombogene Aktivität im Wessler-Test: frei von thrombogener Wirkung bis zu einer Dosierung von	10 FEIBA-E/kg	4 FEIBA-E/kg
Affinitätschromatographie an Dextransulfat-Sephrose		
F. IX-Aktivität eluiert bei	0,14-0,49 m NaCl	0,13-0,50 m NaCl
Maximale F.IX-Aktivität eluiert bei	0,31 m NaCl	0,30 m NaCl
FEIB-Aktivität eluiert bei	0,33-0,49 m NaCl	0,31-0,50 m NaCl
Maximale FEIB-Aktivität eluiert bei	0,41 m NaCl	0,40 m NaCl
Elektrophoretische Auftrennung des Proteins mit F.IX- und FEIB-Aktivität		
α-Globulin, Hauptgipfel	67%	70%
α-Globulin, Schulter	16%	14%
β-Globulin	17%	16%

Fortsetzung	FEIBA-Präparation hergestellt nach	
	Beispiel 1	Beispiel 2
Kallikrein-Aktivität	0	0
Präkallikrein-Aktivator-Aktivität	0	0
% Restaktivität FEIBA nach 1 h Inkubation in F.VIII-Inhibitor-Plasma	65%	57%
% Restaktivität Faktor IX nach 1 h Inkubation in F.IX-Mangelplasma	60%	55%
Inter- α -Trypsininhibitor	0,6 mg/FEIBA-E	0,2 mg/FEIBA-E

P A T E N T A N S P R Ü C H E :

1. Verfahren zur Herstellung einer neuen blutgerinnungsfördernden Präparation auf Basis von Humanproteinen mit einem Gehalt an den Gerinnungsfaktoren II, VII, IX und X und einer Faktor VIII-Inhibitor-Bypass-Aktivität, welche Präparation

- 5 - frei ist von thrombogener Aktivität bis zu mindestens 2 Einheiten FEIBA/kg Kaninchen im thromboseinduzierenden Aktivitätstest nach Wessler
- frei ist von Kallikrein-Aktivität und frei von Präkallikrein-Aktivator-Aktivität - gemessen in einer wässrigen Lösung der Präparation mit einer FEIBA-Konzentration bis zu mindestens 10 Einheiten/ml,
- 10 - affinitätschromatographisch an Dextransulfat-Agarose mittels eines NaCl-Gradienten derart auftrennbar ist, daß das Protein mit Faktor IX-Aktivität bei niedrigerer NaCl-Konzentration eluiert als das Protein mit FEIB-Aktivität, und
- die das Protein mit Faktor IX-Aktivität und das Protein mit FEIB-Aktivität enthaltenden Eluate bei elektrophoretischer Auftrennung α - und β -Globuline enthalten, wobei die Auftrennungskurve im α -Bereich einen Hauptgipfel entsprechend 60 bis 80% des Gesamtproteins, eine daran anschließende Schulter von 10 bis 20% des Gesamtproteins sowie einen an den schulterförmigen Verlauf der Auftrennungskurve anschließenden, schwach ausgeprägten Gipfel im β -Globulinbereich entsprechend einem Gehalt von 10 bis 20% des Gesamtproteins aufweist,
- 15
- 20 dadurch gekennzeichnet, daß Humanplasma mit sulfatierten hochpolymeren Kohlehydraten und/oder mit basischen Ionenaustauschern behandelt und das Proteingemisch mit generierter FEIB-Aktivität adsorbiert wird, worauf es durch Eluieren und Konzentrieren gewonnen wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Plasma zuerst mit sulfatierten hochpolymeren Kohlehydraten kurzzeitig behandelt, das Proteingemisch mit generierter FEIB-Aktivität hierauf an einem Ionenaustauscher auf Dextranbasis adsorbiert und unmittelbar darauf eluiert und konzentriert wird.

3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Plasma mit einem Ionenaustauscher auf Dextranbasis behandelt und nach mindestens zweistündiger Einwirkung das an dem Ionenaustauscher adsorbierte Proteingemisch mit generierter FEIB-Aktivität eluiert und sodann konzentriert wird.

(Hiezu 2 Blatt Zeichnungen)

Humanplasma als Standard - aufgetragen und hierauf im elektrischen Feld aufgetrennt; die Trennung erfolgt dadurch, daß verschieden geladene Proteine im elektrischen Feld verschieden rasch wandern. Zu diesem Zweck wird die mit den Proben versehene Membran in einer speziellen, mit Elektrophoresepuffer gefüllten Zelle 16 bis 18 min bei einer Spannung von 250 V und 4 bis 6 mA anfanglicher Stromstärke behandelt.

Nach Beendigung des Trennvorganges werden die verschiedenen Proteine durch Einlegen der Membran in eine Fixier- bzw. Färbelösung sichtbar gemacht. Nach einigen Spülbädern wird die Membran in einem weiteren Bad transparent gemacht, auf eine Glasplatte aufgetragen und in einem Trockenschrank bei 100°C getrocknet.

Die getrocknete Membran wird nun in einem automatisch registrierenden und integrierenden Densitometer analysiert und ergibt Auftrennungskurven, wie in Fig.2 dargestellt. Die verschiedenen Proteine erscheinen dabei als verschieden starke Banden, deren Flächen den Relativprozentwerten der entsprechenden Proteine proportional sind, wobei diese Flächen durch die automatische Integration des Densitometers bestimmt werden.

Die Zuordnung der verschiedenen Banden bzw. Proteine der Testprobe zu definierten Proteinen bzw. Proteingruppen erfolgt durch Vergleich mit den Banden des als Standard mitanalysierten normalen Humanplasmas. Letzteres wird bei der elektrophoretischen Analyse in 5 Proteingruppen aufgetrennt, welche definitionsgemäß - in der Reihenfolge abnehmender Wanderungsgeschwindigkeiten im elektrischen Feld - wie folgt bezeichnet werden: Albumin, α -Globulin, β -Globulin, Fibrinogen und γ -Globulin.

Die Definition der FEIBA-Einheit sowie ihre Bestimmung (Wirksamkeitstest) ist in der Literatur, u.zw. in der AT-PS Nr.350726 (US-PS Nr.4,160,025, DE-OS 2734821) beschrieben. Die Bestimmung der Aktivität der Gerinnungsfaktoren II, VII, IX und X ist ebenfalls in der vorgenannten Literatur beschrieben.

Die Bestimmung der Restaktivität von FEIBA nach Inkubation in Faktor VIII-Inhibitor-Plasma wird in folgender Weise durchgeführt.

1. Reagenzien:

Die zu verwendenden Reagenzien sind in Verbindung mit der Bestimmung der FEIBA-Einheiten (Wirksamkeitstest) in der AT-PS Nr.350726 (US-PS Nr.4,160,025, DE-OS 2734821) beschrieben.

2. Test:

Von einer auf 50 FEIBA-Einheiten/ml eingestellten Präparation werden mit einer Lösung von 7 g/l Natriumchlorid und 7 g/l Natriumcitrat-2H₂O als Verdünnungsmittel folgende Verdünnungen hergestellt: 1 : 2, 1 : 4, 1 : 8, 1 : 16, 1 : 32 und 1 : 64. Von diesen 6 Verdünnungen wird jeweils eine 1 : 10-Verdünnung in Faktor VIII-Inhibitor-Plasma hergestellt (0,05 ml vorverdünnte Probe + 0,45 ml Faktor VIII-Inhibitor-Plasma).

Diese 1 : 10-Verdünnungen in Faktor VIII-Inhibitor-Plasma ("Inkubationsgemische") werden nun sofort und nach 1 h Inkubation bei 37°C nach folgendem Testschema analysiert:

0,1 ml "Inkubationsgemisch"

0,1 ml Phospholipid-Kaolin-Suspension 1 min bei 37°C inkubieren

0,1 ml m/40 Calciumchlorid

Die Zeit von der Calciumchloridzugabe bis zur Gerinnungsbildung wird mit einer Stoppuhr wie im Wirksamkeitstest gemessen.

3. Berechnung der Restaktivität:

Analog zur Beschreibung im Wirksamkeitstest wird nun mit den Gerinnungszeiten der sofort bestimmten Verdünnungen eine Eichkurve erstellt (unverdünnte Probe = 50 FEIBA-Einheiten/ml). Die Aktivitäten (FEIBA-Einheiten/ml) der 1 h inkubierten verschiedenen Verdünnungen werden nun unter Verwendung der Eichkurve berechnet und in % der jeweiligen Aktivitäten der nichtinkubierten Verdünnungen ausgedrückt. Die Mittelwerte der so berechneten Aktivitäten ergeben dann die durchschnittliche Restaktivität der Probe nach 1 h Inkubation, ausgedrückt in % der Ausgangsaktivität vor Inkubation.

Die Bestimmung der Restaktivität von Faktor IX nach Inkubation in Faktor IX-Mangelplasma

Fortsetzung	FEIBA-Präparation hergestellt nach	
	Beispiel 1	Beispiel 2
Kallikrein-Aktivität	0	0
Präkallikrein-Aktivator-Aktivität	0	0
% Restaktivität FEIBA nach 1 h Inkubation in F.VIII-Inhibitor-Plasma	65%	57%
% Restaktivität Faktor IX nach 1 h Inkubation in F.IX-Mangelplasma	60%	55%
Inter- α -Trypsininhibitor	0,6 mg/FEIBA-E	0,2 mg/FEIBA-E

P A T E N T A N S P R Ü C H E :

1. Verfahren zur Herstellung einer neuen blutgerinnungsfördernden Präparation auf Basis von Humanproteinen mit einem Gehalt an den Gerinnungsfaktoren II, VII, IX und X und einer Faktor VIII-Inhibitor-Bypass-Aktivität, welche Präparation

- 5 - frei ist von thrombogener Aktivität bis zu mindestens 2 Einheiten FEIBA/kg Kaninchen im thromboseinduzierenden Aktivitätstest nach Wessler
- frei ist von Kallikrein-Aktivität und frei von Präkallikrein-Aktivator-Aktivität - gemessen in einer wässrigen Lösung der Präparation mit einer FEIBA-Konzentration bis zu mindestens 10 Einheiten/ml,
- 10 - affinitätschromatographisch an Dextransulfat-Agarose mittels eines NaCl-Gradienten derart auftrennbar ist, daß das Protein mit Faktor IX-Aktivität bei niedrigerer NaCl-Konzentration eluiert als das Protein mit FEIB-Aktivität, und
- die das Protein mit Faktor IX-Aktivität und das Protein mit FEIB-Aktivität enthaltenden Eluate bei elektrophoretischer Auftrennung α - und β -Globuline enthalten, wobei die Auftrennungskurve im α -Bereich einen Hauptgipfel entsprechend 60 bis 80% des Gesamtproteins, eine daran anschließende Schulter von 10 bis 20% des Gesamtproteins sowie einen an den schulterförmigen Verlauf der Auftrennungskurve anschließenden, schwach ausgeprägten Gipfel im β -Globulinbereich entsprechend einem Gehalt von 10 bis 20% des Gesamtproteins aufweist,
- 15
- 20 dadurch gekennzeichnet, daß Humanplasma mit sulfatierten hochpolymeren Kohlehydraten und/oder mit basischen Ionenaustauschern behandelt und das Proteingemisch mit generierter FEIB-Aktivität adsorbiert wird, worauf es durch Eluieren und Konzentrieren gewonnen wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Plasma zuerst mit sulfatierten hochpolymeren Kohlehydraten kurzzeitig behandelt, das Proteingemisch mit generierter FEIB-Aktivität hierauf an einem Ionenaustauscher auf Dextranbasis adsorbiert und unmittelbar darauf eluiert und konzentriert wird.

3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Plasma mit einem Ionenaustauscher auf Dextranbasis behandelt und nach mindestens zweistündiger Einwirkung das an dem Ionenaustauscher adsorbierte Proteingemisch mit generierter FEIB-Aktivität eluiert und sodann

30 konzentriert wird.

(Hiezu 2 Blatt Zeichnungen)

FIG. 1

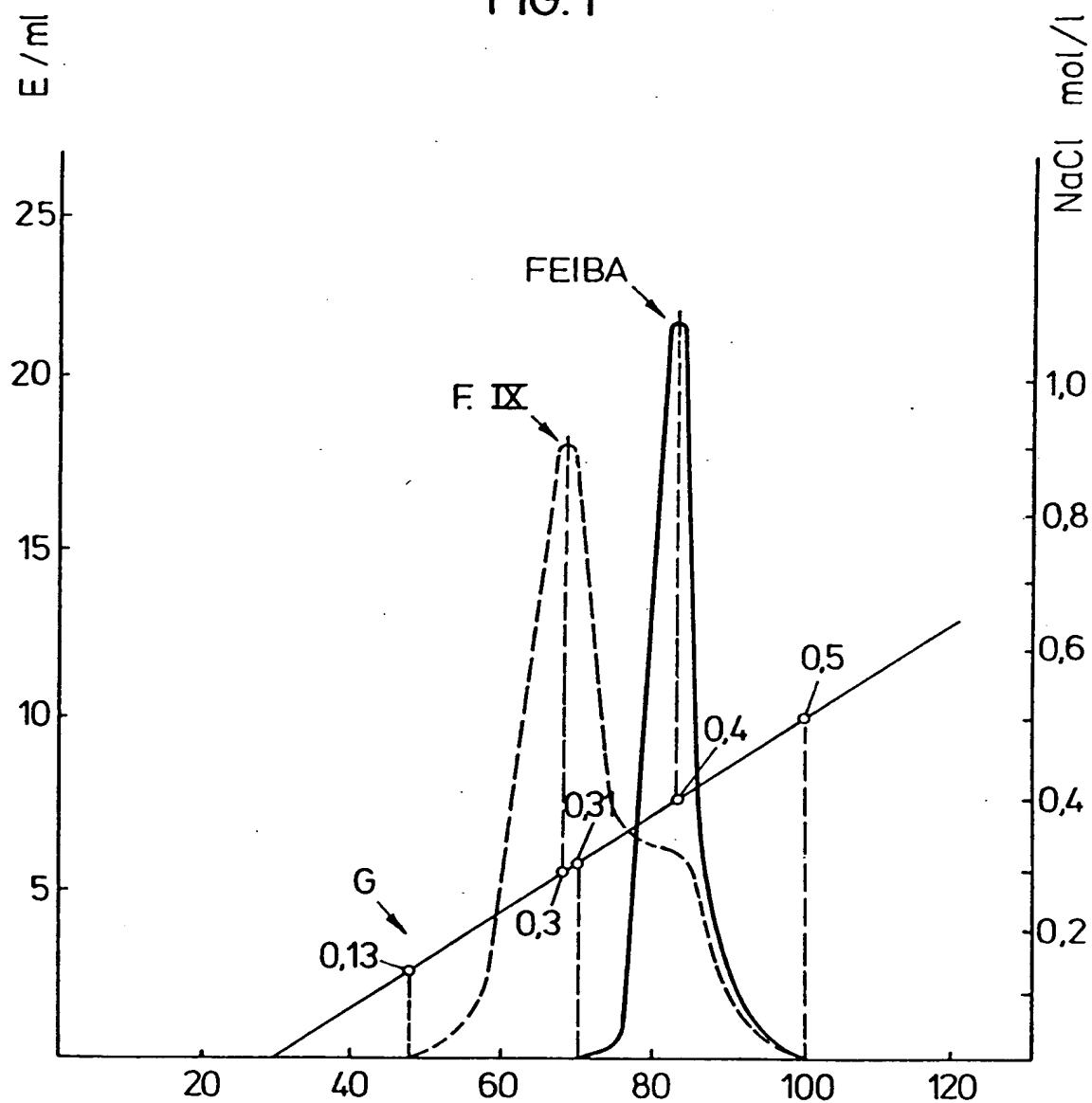


FIG. 2

